

**CONTENIDO DE FLAVONOLES EN UVAS PARA VINO CULTIVADAS  
EN EL VALLE DE CASABLANCA, CHILE<sup>1</sup>**

**Flavonol content of Chilean wine grapes grown in Casablanca Valley, Chile<sup>1</sup>**

**Claudio Ciudad B.<sup>2</sup> y Jorge Valenzuela B.<sup>3</sup>**

**A B S T R A C T**

Antioxidants in plants and their by-products are becoming of increasing relevance, given their detrimental effect on oxidative stress and the ailments therein derived, such as cardiovascular disorders and cancer. Wine, especially red wine, contains flavonols, and moreover, recently foreign literature has recognized the comparatively high levels that Chilean wines possess. As a consequence, it is of interest to classify and evaluate the potential productive concentrations of the flavonols: myricetin and quercetin in Chilean grapes, which pass into the must during the production process. To meet this objective, wine grape samples of Carmenère, Pinot noir, Cabernet Sauvignon, Merlot and Chardonnay were collected in the Casablanca Valley in the 1999 harvest, using a completely randomized design with four repetitions, where each repetition corresponded to a bunch. The proportion of berry skin was determined, and the skins were lyophilised and processed using hydrolysis in the Biochemistry and Vegetable Physiology Laboratory of the La Platina Regional Research Center. Flavonols were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) and expressed as mg kg<sup>-1</sup> of fruit. According to the results of the study, Cabernet Sauvignon and Carmenère varieties had the highest concentrations of flavonols in the fruit; followed sequentially by Merlot, Chardonnay and Pinot noir. These values are consistent with those reported by other authors in the same wine varieties.

**Key words:** quercetin, myricetin, wine, oxidative stress.

**R E S U M E N**

Los antioxidantes en vegetales y sus subproductos están tomando día a día mayor relevancia, dada la influencia detrimental sobre el estrés oxidativo y las dolencias que de él derivan, como enfermedades cardiovasculares y cáncer. El vino, especialmente el tinto, contiene flavonoles, y aún más, recientemente la literatura extranjera ha dado a conocer los altos niveles comparativos que posee el vino chileno. En consecuencia, interesa tipificar y evaluar el potencial productivo varietal de los flavonoles: quercetina y miricetina en la uva chilena, los cuales pasan al mosto durante la vinificación de las variedades tintas. Para cumplir este objetivo, en el valle de Casablanca, durante la vendimia de año 1999, se recolectaron muestras de uvas para vino en madurez de cosecha, de las variedades: Chardonnay, Pinot noir, Merlot, Cabernet Sauvignon y Carmenère, en un muestreo completamente al azar con cuatro repeticiones, en donde cada repetición correspondió a un racimo. En el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Vegetal del Centro Regional de Investigación La

<sup>1</sup>Recepción de originales: 8 de junio de 2000.

Parte del trabajo presentado por los autores del Proyecto FDI N° 011-15.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439-3, Santiago, Chile.

E-mail: cciudad@platina.inia.cl

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439-3, Santiago, Chile.

E-mail: jovalenz@platina.inia.cl

Platina, se determinó la proporción de piel que posee cada uva, las que fueron liofilizadas y procesadas mediante hidrólisis. Utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se cuantificó quercetina y miricetina, y se expresó como miligramos de flavonoles por kilogramo de uva ( $\text{mg flavonoles kg}^{-1}$  uva). De acuerdo a los resultados de este estudio, las uvas de las variedades Cabernet Sauvignon y Carmenère tienen el más alto contenido de flavonoles por kilogramo de uva; la siguen secuencialmente, Merlot, Chardonnay y Pinot noir. Estos valores son consecuentes con aquellos encontrados en vino por otros autores en las mismas variedades.

**Palabras clave:** quercetina, miricetina, vino, estrés oxidativo.

## INTRODUCCIÓN

Existe mucho interés, principalmente en organizaciones internacionales de salud, por las propiedades terapéuticas que puedan tener los alimentos de consumo habitual, especialmente por el aporte de moléculas protectoras (nutracéuticos) contenidas en frutas y hortalizas, y que son el resultado del metabolismo secundario que poseen todos los vegetales (Kinsella *et al.*, 1993). Algunas de estas sustancias, como los polifenoles del tipo  $\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$ , además de otras propiedades bioquímicas, son potentes antioxidantes en las células animales.

Con relación a esto último, estudios epidemiológicos en la población mundial (Chance *et al.*, 1979) han revelado que el mayor porcentaje de mortalidad se debe a desórdenes metabólicos en la célula, principalmente estrés oxidativo, el que es inducido, bajo ciertas circunstancias, por una pequeña proporción del volumen de oxígeno que se respira (aproximadamente 2%), provocando cáncer (Verma *et al.*, 1988; Wattenburg, 1985, 1990; Wei *et al.*, 1990) y/o enfermedades cardiovasculares (Gregory *et al.*, 1990; Hertog *et al.*, 1993). En condiciones normales este efecto deletéreo es neutralizado naturalmente por sistemas enzimáticos y substratos que posee la célula, como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, vitamina C, vitamina E y urato.

Ambas enfermedades degenerativas son el resultado de la pérdida de control del proceso oxidativo iniciándose en compuestos iónicos altamente agresivos, derivados de esta fracción de oxígeno.

Cuando el ataque es sobre los ácidos nucleicos se hace posible el cáncer; si es sobre lipoproteínas de baja densidad ocurre depósito de placas de colesterol en el aparato circulatorio, con la consiguiente obstrucción de las vías circulatorias. Estas especies del oxígeno son los llamados EROs (especies reactivas del oxígeno) entre los que se cuentan: superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hidroxilo ( $\text{HO}^{\bullet}$ ), e hipernitrito ( $\text{ONOO}^{\bullet-}$ ).

Varios investigadores (St. Leger *et al.*, 1979; Renaud y De Lorgeril, 1992; Criqui y Ringel, 1994; Renaud, 1996) dieron a conocer lo que se ha dado en llamar la "paradoja francesa". Observaron que en los franceses a pesar de consumir grasas saturadas en mayor proporción que en otros países, como Estados Unidos y el Reino Unido, la mortalidad por enfermedades coronarias era sólo un tercio de las de aquellos. La diferencia estaba principalmente en el consumo de vino tinto que hacían los galos.

Esta situación ha motivado numerosos estudios para dilucidar las propiedades reductoras de los vinos, y es así que se han implementado técnicas redox para medir el potencial antioxidante de los vinos chilenos, tintos y blancos. Campos y Lissi (1996) y Campos *et al.* (1996) utilizando el procedimiento del blanqueamiento de los radicales catiónicos, ayudado por un reductor sintético, ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), pudieron cuantificar el índice TRAP o poder antioxidante total, siendo 8 veces superior el vino tinto con respecto al blanco.

Frankel *et al.* (1995) detectaron compuestos fenólicos en el vino tinto, identificando flavonoles libres y glicosilados, principalmente quercetina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxiflavona) y miricetina (3, 3', 4', 5, 5', 7-hexahidroxiflavona) los cuales son capaces de neutralizar la acción deletérea de los EROs. En Chile, Leighton *et al.* (1997) estudiaron también los efectos protectores del vino en el estrés oxidativo y su relación con las catequinas.

McDonald *et al.* (1998), en un estudio de prospección de flavonoles en 65 muestras de vino provenientes de todo el mundo, pudieron comprobar que comparativamente los vinos tintos de Chile tenían las más altas concentraciones de estos compuestos fenólicos.

Obviamente la fuente originaria de estas moléculas en el vino es la uva, por tanto cualquier investigación sobre la conducta de estas sustancias en el proceso de vinificación y su presencia en el subproducto se debe iniciar en la uva, co-tejando en primera instancia su efecto varietal, sobre todo si se pretende controlar la concentración de flavonoles. En consecuencia, el objetivo primordial de esta investigación fue determinar la concentración de flavonoles en uvas provenientes del Valle de Casablanca (V Región), para lo cual se seleccionaron las variedades: Pinot noir, Merlot, Cabernet Sauvignon, Carmènère y Chardonnay, en las que se cuantificó quercetina y miricetina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el Valle de Casablanca (33°18' lat. Sur, 71°23' long. Oeste), se colectaron muestras de uva en madurez de cosecha (22 °Brix) de cinco variedades: Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Carmenère, Pinot noir y Merlot, en las viñas Veramonte, Tapihue y El Ensueño. Las plantas de 5 años estaban conducidas en sistema de espaldera vertical de 3 alambres, en un marco de plantación de 2,5 x 2,5 m. La poda fue en Doble Guyot con pitones de reemplazo. El sistema de riego en todos estos cuarteles es tecnificado por goteo con agua de pozo profundo.

Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Vegetal del Centro Regional de Investigación (CRI) La Platina, perteneciente al Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), y procesadas para cuantificar los flavonoles quercetina y miricetina. El diseño experimental usado fue completamente al azar con 4 repeticiones, donde cada repetición correspondió a un racimo de la respectiva variedad. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) y luego las medias fueron separadas utilizando la Prueba de Comparación Múltiple de Duncan ( $P < 0,05$ ).

Una vez cosechados los racimos, las bayas fueron inmediatamente aisladas, separadas de sus pieles, y pesadas para el cálculo de porcentaje de piel fresca de la baya (% PF), y desecadas a 100 °C en estufa hasta peso constante para el cálculo de porcentaje de materia seca de las pieles (% MS P), con el fin de obtener la proporción de piel seca de la uva fresca, dato que es crucial para el cálculo en rendimiento de flavonoles totales por kilogramo de uva fresca ( $\text{mg flavonoles kg}^{-1}$  uva fresca). Aproximadamente 3 g del material sobrante de las pieles fue congelado a -65 °C y guardado hasta su procesamiento. Posteriormente fue humedecido y homogeneizado a 20.000 rpm por 1 min en un equipo homogenizador (Omni Mixer, Sorvall, EE.UU.). Esta pasta congelada fue rápidamente colocada en frascos especiales para ser liofilizadas por 12 h, en un equipo de deshidratación en frío (Freeze Dry System, Freezone 18, Labconco, EE.UU.). Una vez deshidratadas las pieles fueron envasadas inmediatamente en frascos de vidrio de 15 mL y selladas bajo atmósfera de nitrógeno, a presión normal, hasta su posterior extracción y análisis.

### Extracción y análisis de quercetina y miricetina en pieles de uva liofilizadas

De acuerdo a la técnica de cuantificación de miricetina y quercetina en vino usando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), propuesta por Crozier *et al.* (1997), se desarrolló un método *ad hoc* modificado para extraer y

cuantificar estos flavonoles en material sólido deshidratado proveniente de las pieles. Éste consistió sustancialmente en reemplazar la muestra de vino líquida de la técnica original por un equivalente sólido de material liofilizado, pieles de baya de uva. En conformidad con los cálculos estequiométricos para el vino, fue necesario igualar el aporte en flavonoles que hacen 300 mL de vino, basándose en los antecedentes disponibles: % PF y % MS P y en conocimiento que aproximadamente se requieren 1,5 kg de uva para producir un litro de vino. Después de las diluciones efectuadas, resulta que 6 mg de piel liofilizada entregarían 12.000 ng de flavonoles, que es el aporte de un vino que contiene 40 mg flavonol L<sup>-1</sup>. Esto representa una inyección neta en el cromatógrafo de 240 ng de flavonol.

#### **Técnica analítica para evaluar miricetina y quercetina en uva**

Puesto que los flavonoles se encuentran en la piel de la uva, libres y conjugados a monosacáridos, para distinguirlos y cuantificarlos fue necesario realizar previo al análisis propiamente tal, una hidrólisis ácida en los liofilizados, proceso llevado a cabo en frasco de reacción de 3 mL sellado con tapa rosca (V-vial, Pierce, EE.UU.) en un equipo calefactor (Reactitherm, EE.UU.) a 90 °C por 2 h, ayudado por agitación magnética y ácido clorhídrico 1,2 M en la solución acuosa de metanol al 50% que contiene 5 mg morina (2', 3, 4', 5, 7-pentahidroxiflavona) como estándar interno y 20 mM de sodio dietil ditio carbamato, como antioxidante.

De acuerdo a estas consideraciones, se colocó en el interior del frasco de reacción: 15 mg de piel liofilizada, 400 mL de HCl 6 M (solución stock), 600 mL de H<sub>2</sub>O, y 1 mL de metanol que contiene sodio dietil ditio carbamato 40 mM y 5 mg de morina (solución stock).

Una vez terminado el proceso anteriormente indicado, se filtró el sobrenadante a través de microembudos (Swinex, Millipore, EE.UU.) con

filtros de membrana hidrofílicos GV (Durapore, EE.UU.), en polivinilo fluorado (PVDF) de 0,2 mm. Del producto filtrado de la hidrólisis se tomó una alícuota equivalente a 100 mL que se llevó a 250 mL con agua destilada ajustada a pH 2,5 con ácido fosfórico (2 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> agua). De esta última dilución se inyectaron 50 a 100 mL en el cromatógrafo, dependiendo de la concentración de flavonol presente.

Se utilizó un cromatógrafo modular automático (MERCK-HITACHI, Alemania), conformado por las siguientes partes: detector de arreglo de diodos L-7450, bomba cuaternaria L-7100, muestreador automático L-7250, interfase D-7000, HPLC System Manager Software, desgasificador L-7612, horno de columna L-7350, columna (Symmetry C-18 250 \* 3, 4 mm WATERS, EE.UU.), y precolumna (Symmetry C-18 10\*4, 4 mm WATERS, EE.UU.).

#### **Condiciones cromatográficas:**

Temperatura: 35 °C; fase móvil: acetonitrilo/agua pH 2,5 ajustada con ácido fosfórico 85% (2 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> agua); gradiente: acetonitrilo 20 a 40% en 20 min; flujo: 1 mL min<sup>-1</sup>; inyección: 50 a 100 mL; detector espectrofotométrico: longitud de onda (l) visible a 370 nm (220 - 450 nm).

**Estándares:** miricetina, quercetina y morina (estándar interno).

Se preparó una solución stock estándar que contenía 50 mL de metanol y 50 mL de ácido fosfórico al 2% más 900 mg de sodio dietil carbamato de sodio. En 100 mL de esta solución se disolvió en forma conjunta miricetina, quercetina y morina, 3,5 mg de cada uno. Ésta fue mantenida en refrigeración y libre de luz hasta su utilización. Las soluciones de trabajo para la curva de calibración se hicieron sobre la base de diluciones del stock e inyecciones de 50 mL en el cromatógrafo, en un rango de 18 ng hasta 350 ng de cada flavonol por inyección.

## Reactivos y Solventes

Agua destilada HPLC, ácido fosfórico 85% PA, ácido clorhídrico 37% PA, dietil ditio carbamato de sodio PA, acetonitrilo HPLC, metanol HPLC, todos productos Merck, en tanto que quercetina patrón, miricetina patrón, y morina patrón, eran productos SIGMA.

Todos los solventes fueron sometidos a un proceso de eliminación de gases residuales en un aparato de ultrasonido (Balsonic, Bauch & Lomb, EE.UU.).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cromatograma

En la Figura 1, a modo de ejemplo, se presenta un cromatograma de la separación y evaluación del contenido total de flavonoles en la piel de una muestra de uva, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en gradiente y fase inversa, para la cuantificación de quercetina y miricetina, después de hidrolizar pieles liofiliz-

zadas de uva en presencia de sodio dietil ditio carbamato y morina como estándar interno.

### Proporción y contenido

La información de las 20 muestras analizadas (5 variedades x 4 repeticiones) aparece en el Cuadro 1 y Figura 2, representada por valores promedios de los resultados obtenidos de las variedades de uva en estudio: Pinot noir, Merlot, Cabernet Sauvignon, Carmenère y Chardonnay. Para obtener el contenido de flavonoles por kilogramo de uva, objetivo principal de este trabajo, se determinó la proporción porcentual de piel seca (% PS) de cada variedad de uva para vino.

La matriz portadora de los flavonoles en la uva es la piel de la baya. Por tal razón, fue determinante calcular la proporción en peso, en forma porcentual, de este constituyente en sus formas: húmeda (% PF) y seca (% PS). Es así, que el mayor % PF y % PS se obtuvo en Cabernet Sauvignon, y el menor en Carmenère. Pinot noir, Merlot y Chardonnay fueron similares entre sí, con valores intermedios. Este resultado es una

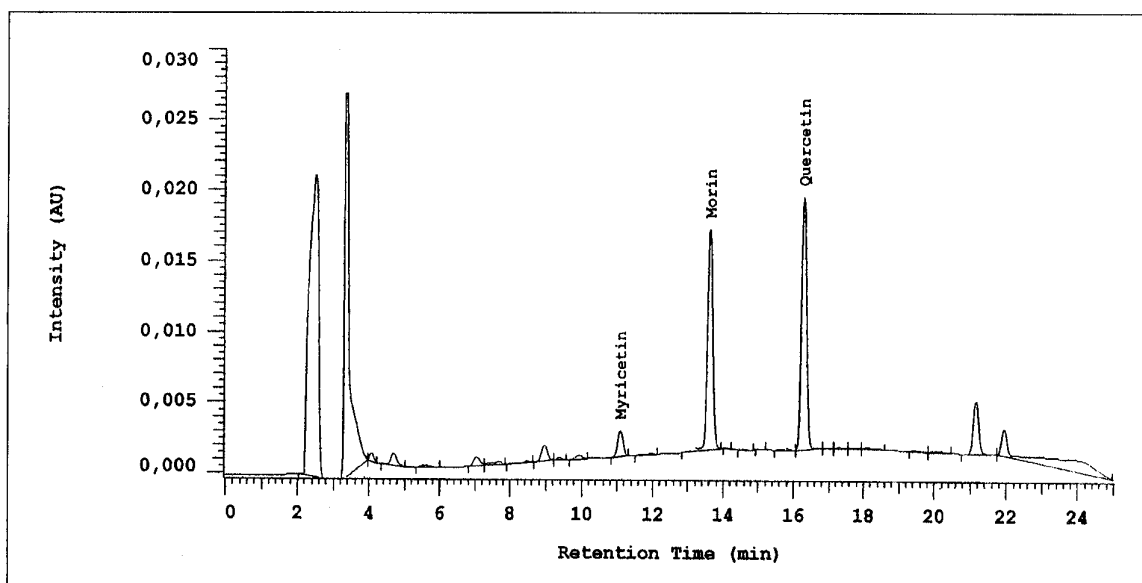


Figura 1. Cromatograma de separación y cuantificación de miricetina y quercetina en extracto de piel de uva, usando morina como estándar interno.

Figure 1. Separation and quantification chromatogram of myricetin and quercetin in grape skin extracts, using morine as an internal standard.

**Cuadro 1. Porcentaje de piel fresca y seca en baya, y contenido de quercetina, miricetina y flavonoles por kilogramo de piel seca, y por kilogramo de uva, en cinco cultivares de vid para vino del Valle de Casablanca, Chile. Vendimia 1999**

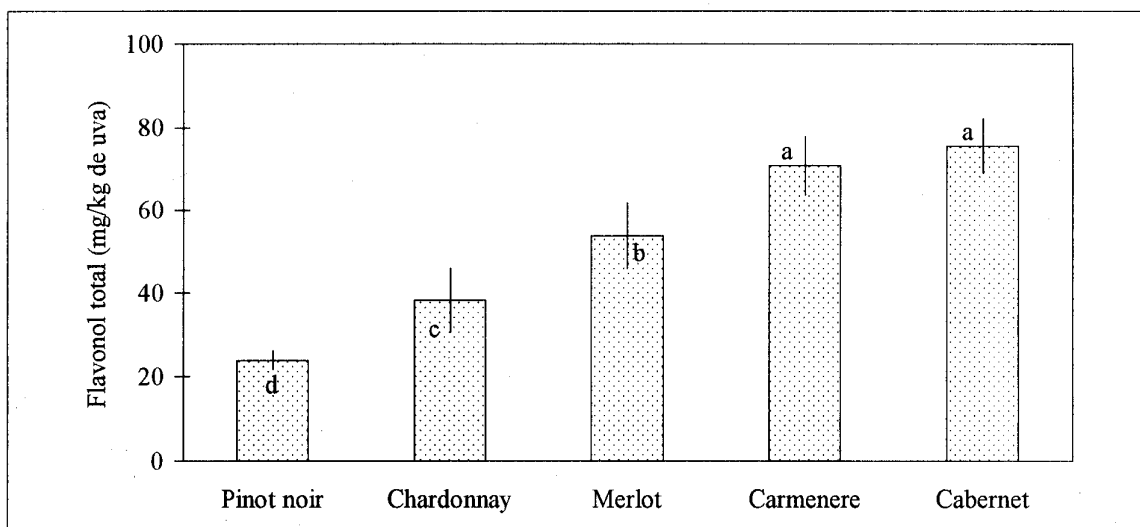
**Table 1. Percentage of fresh and dry skin in berries, and content of quercetin, myricetin and flavonols per kilogram of dry skin and per kilogram of grape, of five wine varieties from Casablanca Valley, Chile. 1999 harvest**

Cultivar	Proporción		Contenido			
	Piel fresca %	Piel seca %	Quercetina mg kg <sup>-1</sup> PS	Miricetina mg kg <sup>-1</sup> PS	Flavonoles mg kg <sup>-1</sup> PS	Flavonoles mg kg <sup>-1</sup> uva
Pinot noir	11,5 b*	3,9 b	555 c	49 c	604 d	24 d
Merlot	11,7 b	3,6 bc	1.105 b	381 b	1.486 b	54 b
Cabernet Sauvignon	15,5 a	4,5 a	1.189 b	482 b	1.671 b	76 a
Carmenère	10,0 c	2,8 d	1.565 a	916 a	2.482 a	71 a
Chardonnay	12,0 b	3,4 c	1.055 b	58 c	1.114 c	38 c

\*Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes Duncan ( $P \leq 0,05$ )

PS = piel seca.

Flavonoles = quercetina + miricetina.



**Figura 2. Contenido promedio de flavonoles en 5 variedades de uva del Valle de Casablanca. Vendimia 1999.**

**Figure 2. Average flavonol content in 5 grape varieties of the Casablanca Valley. 1999 harvest.**

clara expresión varietal en la proporción de la matriz piel con respecto a la uva.

En todas las variedades estudiadas, sobre la base de piel seca, los niveles de quercetina están sobre los de miricetina, señalando la abundancia relativa de este componente en la uva. En el mismo sentido, el mayor contenido de quercetina se

obtuvo en Carmenère, seguido conjuntamente por Cabernet Sauvignon, Merlot y Chardonnay, con 75% de lo que contiene Carmenère. Pinot noir contiene la mitad de estos tres últimos.

Con respecto a miricetina, el nivel más alto lo presentó la variedad Carmenère, bajando casi a la mitad en Cabernet Sauvignon y Merlot. Las

variedades Pinot noir y Chardonnay presentaron valores notoriamente bajos.

En relación al contenido total de flavonoles (quercetina + miricetina) por kilogramo de piel seca, se puede observar que Carmenère presentó la más alta concentración. Cabernet Sauvignon y Merlot tuvieron valores relativamente altos. Los siguen secuencialmente, Chardonnay y Pinot noir, siendo este último el más bajo de todos.

La situación cambia cuando la concentración se expresa sobre la base de flavonoles por kilogramo de uva fresca, y es así que Cabernet Sauvignon y Carmenère no presentaron diferencias significativas, siendo estas dos variedades poseedoras de los valores más altos. Les siguen secuencialmente, Merlot, Chardonnay y Pinot noir, que son diferentes entre sí. Curiosamente, Chardonnay tuvo mayor contenido de flavonoles que su variedad hermana, Pinot noir. Pero ambas variedades poseen niveles bajos y similares de miricetina.

Es interesante señalar que si bien es cierto que la uva de la variedad Chardonnay presenta valores

de flavonoles incluso más altos que Pinot noir, esta propiedad no aparece significativa ( $P > 0,05$ ) en los vinos que origina, basándose en el hecho que el proceso de vinificación del vino blanco no contempla el contacto del mosto con las pieles de la baya donde se produce lixiviación de traspaso de flavonoles.

Los valores presentados en uvas concuerdan con los valores encontrados por Mc Donald *et al.* (1998) en los vinos de Chile, sobre todo Cabernet Sauvignon y Merlot, ya que ambos resultados guardan perfecta proporcionalidad.

### CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de este estudio, las uvas de las variedades Cabernet Sauvignon y Carmenère tienen el más alto contenido de flavonoles por kilogramo de uva. Lo siguen secuencialmente, Merlot, Chardonnay y Pinot noir, todas provenientes del Valle de Casablanca.

Estos valores son consecuentes con aquellos encontrados por otros autores en vinos de las mismas variedades tintas.

### LITERATURA CITADA

- 
- Campos, A.M., and E.A. Lissi. 1996. Total antioxidant potential of Chilean wines. *Nutrition Research* 16:385-389.
- Campos, A.M., J. Escobar, and E.A. Lissi. 1996. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wines. *J. Braz. Chem. Soc.* 7:43-49.
- Criqui, M.H., and B.L. Ringel. 1994. Does the diet or alcohol explain the French Paradox *Lancet* 344:1719-1723.
- Crozier, A., E. Jensen, M.E.J. Lean, and M.S. McDonald. 1997. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 761:315-321.
- Chance, B., H. Sies, and A. Boberis. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organisms. *Physiol. Rev.* 59:527-605.
- Frankel, E.N., A.L. Waterhouse, and P.L. Teissedre. 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidants activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 43:890-894.
- Gregory, J., K. Foster, H. Tyler, and M. Wiseman. 1990. The dietary and nutritional survey of British adults. 393 p. Her Majesty's Stationary Office (HMSO), London, United Kingdom.

- Hertog, M.G.L., E.J.M. Feskens, P.Ch. Hollman, M.B. Katan, and D. Kromhout. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease the Zutphen elderly study. *Lancet* 342:1007-1011.
- Kinsella, J.E., E.N. Frankel, B. German, and J. Kanner. 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plants foods. *Food Technology* 47:85-89.
- Leighton, F., C. Castro, C. Barriga, e I. Urquiaga. 1997. *Vino y Salud. Estudios epidemiológicos y posibles mecanismos de los efectos protectores.* *Rev. Med. Chile* 125:483-491.
- McDonald, M.S., M. Hughes, J. Burns, M.E.J. Lean, D. Matthews, and A. Crozier. 1998. Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J. Agric. Food Chem.* 46:368-375.
- Renaud, S. 1996. The French Paradox. p. 21. *In* Shockley, C.S., (ed.) *Medically, is wine just another alcoholic beverage.* Proceedings of the Wolf Blass Foundation International Wine and Health Conference, June 12-13, 1996. Sidney, Australia.
- Renaud, S., and M. De Lorgeril. 1992. Wine, alcohol platelets and the French Paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339:1523-1526.
- St. Leger, A.S., A.L. Cochrane, and F. Moore. 1979. Factor associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet* 1:1017-1020.
- Verma, A.K., J.A. Johnson, M.N. Gould, and M.A. Tanner. 1988. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene and N-nitro methylurea induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res.* 48:5754.
- Wattenburg, L.W. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* 45:1.
- Wattenburg, L.W. 1990. Inhibition of carcinogenesis by minor nutrient constituents of the diet. *Proc. Nutr. Soc.* 49:173.
- Wei, H., L. Tye, E. Bresnick, and D.F. Birt. 1990. Inhibitory effect of apigenina, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumour promotion in mice. *Cancer Res.* 50:499.